

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08404

研究課題名(和文) 小胞体を新規標的に据えたタンパク質凝集体難病治療法の創出

研究課題名(英文) Development of ER-targeted therapeutics against protein aggregation diseases

研究代表者

山崎 哲男 (YAMAZAKI, Tetsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：90330208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の提案は「シャペロン分子クリスタリンの小胞体膜上への強制発現によって、タンパク質凝集体の形成・蓄積を阻害し得る」ことを見出した申請者の実績に基づく。小胞体膜周囲の微小環境に備わる凝集体形成阻害能の臨床応用に向けて、分子基盤の整備を目指した。期間内に小胞体繫留型クリスタリン結合分子を単離し、その中の一つ小胞体膜貫通タンパク質CLN6が凝集体形成阻害能を支える分子実体である点を示した。加えて、小胞体繫留型クリスタリンおよびCLN6の凝集体形成阻害能の有効性はTDP-43をはじめとする多様な疾患関連タンパク質にも及ぶことを明らかにし、小胞体マニピュレーションの汎用性を提唱した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to develop therapeutic interventions against protein aggregation diseases. Mutations within the alphaB-crystallin (aBC) gene are linked to crystallinopathy, characterized by intracellular accumulation of protein aggregates. We previously demonstrated that enforced expression of aBC on the endoplasmic reticulum (ER) prevented aggregation of the R120G aBC mutant, suggesting that manipulation of the ER-anchored aBC (ERaBC) target is effective for protein aggregation diseases. In this study, CLN6, an ER transmembrane protein, was isolated as an ERaBC binder. We revealed that CLN6 not only mediates the anti-aggregate activity of ERaBC but also prevents the R120G mutant from aggregating independently of ERaBC. CLN6 profoundly inhibited aggregation of the ALS-associated TDP-43 variant as well. Overall, we conclude that dictating CLN6 would be a promising strategy for a wide array of protein aggregation diseases.

研究分野：病理学

キーワード：小胞体 CLN6 凝集体

1. 研究開始当初の背景

本研究はタンパク質凝集体難病の治療法開発に主眼を置く。タンパク質凝集体難病は文字通り異常タンパク質凝集体の形成・蓄積を共通の特徴とする一連の疾患群であり、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、そして本研究で注目する筋肉難病クリスタリノパチーなど多彩な病気が含まれる。“難病”と言われるだけあっていずれの疾患についても根治療法はない。そのような中において、研究代表者は小胞体膜を取り巻く微小環境に手を加えると“タンパク質凝集体形成を抑制する細胞内システム”が稼働することを世界に先駆けて見出し(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014)、当現象のタンパク質凝集体難病治療への応用を着想するところとなった。小胞体膜周囲の微小環境をマニピュレーションするために研究代表者が用いたのは、シャペロン分子 Bクリスタリン(BC)である。BCは通常であれば細胞質に均一に散在するが、研究代表者は同分子を小胞体膜上に強制的に発現させた。この操作が加わった細胞内では、クリスタリノパチーの発症・増悪にかかわるR120G BC変異体(以降、R120G変異体)の凝集が未然に防がれた。その一方で、野生型BCを過剰発現した場合には、R120G変異体の凝集は抑制されなかった。BCの小胞体膜上への集約こそが凝集体形成抑止能を生み出すことが明らかとなると同時に、小胞体繫留型クリスタリン(ER BC)の標的分子が小胞体膜上もしくはその近傍に存在することが示唆された。この標的分子はER BCに備わる凝集体形成抑制能を支える分子実体である可能性が高く、当該分子の同定と機能発現様式の解明は、小胞体マニピュレーションの臨床応用に向けての第一歩であると研究代表者は考え、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質凝集体難病の治療戦略の創出である。“できてしまった凝集体にどう対峙するのか？”に注目するこれまでの同病対策とは異なり、本研究では“どうすれば凝集体を作らせず(蓄積させず)に済むのか？”、すなわち形成予防に焦点を合わせる。目的達成のために小胞体膜周囲の微小

環境を構成する分子を新規標的に据え、その制御法を確立する。本研究の提案は「小胞体膜微小環境を人為的に操作すると、R120G変異体の凝集を予防できる」ことを世界に先駆けて見出した研究代表者の実績(Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014)に基づく。期間内に小胞体マニピュレーションの分子基盤を整備するとともに、R120G変異体以外の幅広い易凝集性タンパク質に有効であるのかを検討する。タンパク質凝集体難病に分類される多様な疾患、そのいずれに関しても根治療法はない。本研究は汎用性の高い治療ツールの提供を通してこの現状を打破し、社会的要求に応える可能性が高い。

3. 研究の方法

(1)ER BCがタンパク質凝集体形成を阻害するために必要な小胞体膜分子の単離・同定

ER BCの機能発現様式を解明するためには、ER BCの標的分子すなわち同分子と結合し、タンパク質凝集体形成阻害に協同する小胞体膜分子の単離・同定が不可欠である。そこで、細胞抽出液からのアフィニティー精製を行い、質量分析法によって当該分子を同定する。単離・同定された複数のタンパク質それぞれを細胞内からノックダウンしたうえで、ER BCとR120G変異体を共発現し、タンパク質凝集体形成抑制能への影響を評価する。ノックダウンしたタンパク質がER BCの標的分子であるならば、ER BCは働きかける対象を失う結果、凝集体形成抑制能を発揮できなくなる。逆にER BCの凝集体形成抑制能がノックダウンの影響を受けずに維持される場合は、当該タンパク質はER BCと機能共役していないか、もしくはその喪失の影響が同様の機能を有する他のタンパク質の働きによってマスクされた可能性が高い。

(2)広汎な易凝集性タンパク質に対する小胞体マニピュレーションの有効性の検討

疾病ごとにタンパク質凝集体を形成する原因遺伝子産物が異なる。ALSであればTDP-43、パーキンソン病であれば α -シヌクレインが凝集体形成・蓄積を引き起こす代表例である。R120G変異体に対する効果を評価した際と同

様に、それぞれの原因遺伝子産物と ER BC を細胞株内で共発現させ、凝集体形成・蓄積への影響を解析する。

4. 研究成果

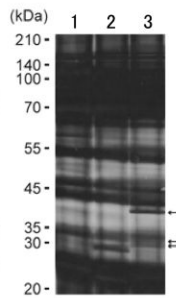
(1)ER BC 結合分子として CLN6 を単離・同定

図1に示すように ER BC に特異的に結合するタンパク質を複数単離・同定した。質量分析法によって、その中の一つが小胞体膜貫通タンパク質 CLN6 であることが判明した。

図1

レーン1: mycのみ
レーン2: mycタグ付き野生型αBC
レーン3: mycタグ付きERαBC

Myc抗体による免疫沈降物を SDS-PAGEで展開した。質量分析に供したのはレーン3から切り出したタンパク質バンド(←)。



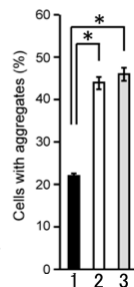
(2)CLN6はER BCのエフェクター分子としてはたらく

ER BC は CLN6 を介してその凝集体形成阻害能を発揮するのか？という点について検証するために、CLN6 をノックダウンした細胞内での R120G 変異体の凝集の程度を解析した。図2に示すようにノックダウンには2種類の CLN6 siRNA を用いた。

図2

1: scrambled siRNA
2: CLN6 siRNA duplex A
3: CLN6 siRNA duplex B

上記1-3のsiRNAをそれぞれトランスフェクションした48時間後に、R120G変異体とERαBCをトランスフェクションし、その後の蛍光観察に供した。



CLN6 のノックダウンに伴って、凝集体陽性細胞の比率が上昇、換言すれば ER BC による抑制効果が減弱したことから、R120G 変異体に対する凝集体形成抑制能は ER BC と CLN6 の機能共役を反映したものである点明らかになった。

(3)CLN6はER BC非存在下でも凝集体形成を

抑制する

ER BC の R120G 変異体への働きかけを媒介する分子実体が CLN6 であることを明らかにしたので、引き続いて CLN6 それ自身が ER BC 非依存的に凝集体形成抑制能を発揮する可能性について検討した。

図3

1: R120G変異体と野生型αBC
2: R120G変異体とERαBC
3: R120G変異体とCLN6

上記1-3の組み合わせで発現ベクターをトランスフェクションした後、蛍光観察に供した。

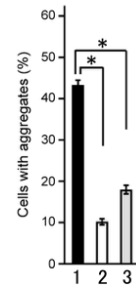


図3に示すように、CLN6 を過剰発現すると ER BC の発現時と同様に R120G 変異体の凝集が抑制された。したがって、CLN6 は ER BC に依存することなく凝集体形成を阻害できることが示された。

(4)内因性 CLN6 はタンパク質凝集体形成に対して抑制的役割を果たす

細胞内で CLN6 タンパク質レベルを上昇させた場合に、凝集体形成を未然に防ぐ分子機構を稼働し得ることを明らかにした。しかしながら、これはあくまでも過剰発現実験の結果であって、生理的な状況下で CLN6 が易凝集性タンパク質に対抗する役割を担っているかどうかを示したものではない。そこで CLN6 ノックダウン細胞内での R120G 変異体の凝集体形成について解析し、この疑問への回答を試みた。

図4

1: scrambled siRNA
2: CLN6 siRNA duplex A
3: CLN6 siRNA duplex B

上記1-3のsiRNAをそれぞれトランスフェクションした48時間後に、R120G変異体のみをトランスフェクションし、その後の蛍光観察に供した。

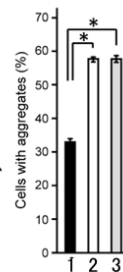


図4に示すように、CLN6 のノックダウンは図2で使用したのと同じ2つの異なる siRNA duplex でそれぞれ行った。いずれの場合も

R120G 変異体の凝集の程度が上昇した。したがって、生理的な状況下で内因性の CLN6 が凝集体形成を負にコントロールしていることが明らかとなった。

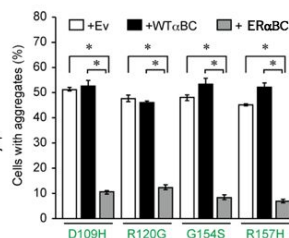
(5)ER BC は一連の病原性クリスタリン変異体の凝集を抑制する

臨床応用を目指す上では、ER BC を用いた小胞体膜微小環境のマニピュレーションが多種多様な病因性タンパク質に奏効することが望まれる。そこで、“ER BC は R120G 変異体以外に凝集体形成抑制能を発揮し得るか? ”、この点について2段階に分けて検証した。

第1段階として、R120G を含む一連の BC ミスセンス変異体の凝集が ER BC によって抑制されるか否かを検討した。本研究のモデル疾患クリスタリノパチーは骨格筋の委縮を主徴候とするが、心筋障害、白内障を併発することがある。発現する BC 変異体が異なる家系間では、症状に違いがみられる事実を踏まえると、発症メカニズムは単一ではなく、BC 変異体ごとに独自の病態関連シグナルを伝達することが想定される。図5に示すように本研究では R120G を含む4つの易凝集性 BC 変異体を対象にした。

図5

4つの α BCミスセンス変異体(D109H, R120G, G154S, R157H)を野生型 α BC(WT α BC)もしくはER α BCと組み合わせてトランスフェクションした後、蛍光観察に供した。



クリスタリノパチー家系の症状の相違に基づけば、これらの変異体は機能・構造的に一様ではないことが予想される。それにもかかわらず、いずれの BC 変異体も、ER BC との共発現下ではその凝集が顕著に抑制された。そこで ER BC の汎用性を検討する第2段階として、クリスタリノパチー以外の凝集体難病に関連する病原性タンパク質にまで解析対象を広げた。その中で、筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子産物 TDP-43 の凝集が ER BC によって阻害される予備実験結果を得た。数年前にアイスバケツチャレンジが話題となったように筋萎縮性側索硬化症の治療法開発は世界レベルの課題である。

本研究の成果は筋萎縮性側索硬化症への現代医学の挑戦を強力に推進するとともに、凝集体難病全般を克服する端緒となる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Yamashita A., Hiraki Y. and Yamazaki T.
Identification of CLN6 as a molecular entity of endoplasmic reticulum-driven anti-aggregate activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 487, 917-922, 2017. 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.002

[学会発表](計 10件)

平木友理, 山崎哲男

「タンパク質凝集体難病の克服に向けた小胞体操作法の開発」第90回蔵本免疫懇話会、徳島大学青藍会館1階大会議室、2017年11月21日、徳島大学藤井節郎ホール(口頭発表)

山崎哲男

「タンパク質凝集体難病の克服に向けた小胞体操作法の開発」稀少疾患プロジェクトオープンセミナー 2017年6月22日、立命館大学薬学部サイエンスコア5階 教員会議室(招待講演)

山下ありさ, 山崎哲男

「小胞体マニピュレーションがもたらす抗凝集体活性の分子基盤」第16回四国免疫フォーラム、2017年6月17日、香川大学医学部 講義棟1階大会議室B(香川県木田郡)(口頭発表)

Yamashita A., Nakatsuru T., Saito H., Hiraki Y. and Yamazaki T.

ER Manipulation: A promising therapeutic intervention for protein aggregation diseases.
The 3rd International Symposium on Regenerative Rehabilitation in Kyoto, Feb. 11, 2017, Sugiura Community Care research Center, Kyoto University (口頭およびポスター発表)

山崎哲男

「凝集体難病の克服に向けた小胞体操縦法」

福井大学医学系研究科 第 567 回学内セミナー
— 2017 年 1 月 27 日, 福井大学医学部 研究棟 3 階会議室 (招待講演)

山下ありさ, 山崎哲男

「タンパク質凝集体難病の克服に向けた小胞体操作の分子基盤」第 79 回蔵本免疫懇話会, 徳島大学青藍会館 1 階大会議室, 2016 年 7 月 27 日, 徳島大学青藍会館大会議室(口頭発表)

山下ありさ, 山崎哲男

「タンパク質凝集体難病の克服に向けた小胞体操作の分子基盤」第 15 回四国免疫フォーラム, 2016 年 6 月 26 日, 高知大学医学部 (高知県南国市) (口頭発表)
山下ありさが[第 15 回四国免疫フォーラム奨励賞]を受賞

Yamazaki T.

ER as a potential therapeutic target for protein aggregation disease. The Fifth Bizan Immunology Symposium at University of Tokushima, Mar. 3-4, 2016 (口頭発表)

山下ありさ, 山崎哲男

「小胞体を標的とした凝集体難病治療法開発」第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2015 年 10 月 31 日, 高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市) (口頭発表)

山下ありさ, 山崎哲男

「小胞体マニピュレーションに基づく凝集体難病治療法の創出」第 14 回四国免疫フォーラム, 2015 年 6 月 20 日, 愛媛大学医学部 40 周年記念講堂 (愛媛県東温市) (口頭発表)

山下ありさが[第 14 回四国免疫フォーラム奨励賞]を受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

徳島大学広報誌とく talk (171 号) 最先端研究探訪「小胞体操作によって凝集体形成を防ぎ、タンパク質凝集体難病を予防する」

http://www.tokushima-u.ac.jp/docs/2018040300019/files/171_2saisentan.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 哲男 (YAMAZAKI, Tetsuo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 90330208

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし